組織培養苗之健康管理

文紀鑾[1]

摘 要

在健康種苗產業發展中影響成功的因子很多，組織培養能夠成功的管理是因為所有生產條件能被控制，其中最重要的因素就是能後夠控制微生物污染及突變。健康種苗的管理應具備：1.健康的母本與培植體。2.生產健康種苗之組織培養作業管理。3.病毒的檢測及控制。4.組織培養健康種苗的認証。

關鍵詞：組織培養、健康種苗、微生物污染、突變

前 言

組織培養應用在健康種苗生產體系其主要內容應包括去病毒技術與控制變異種苗繁殖技術。在台灣此類技術應用在花卉種苗繁殖最多，尤其是蘭科植物，在國際行銷上更顯重要，另外，在果樹類與蔬菜類作物也利用此技術病毒病害病及細菌性病害，此在香蕉、葡萄、百香果、馬鈴薯與草莓已執行多年，成效顯著，多數人在談健康種苗重點多放在病毒病，但詳細的解釋無病毒苗(virus-free seedling)，指的是無特定病毒病之苗，而非無所有病毒之苗。

組培苗微生物污染

組織培養的培植體來自自然界，在大自然中可在植物上發現的微生物，對植物而言可分為有害(一般病原菌)、有益(菌根菌、溶磷菌等)、或無害無益，但對廣義的組織培養而言，都視為微生物污染(microbial contamination)，都應去除，這也是目前大家普遍可接受的定義，但在組培中少數無害也無益，甚至有益的微生物，如在金線蓮培養中發現一些菌種，反而有助於移植成活率，早期蘭花的無菌播種，會利用蘭菌共培養，而促進種子發芽，但以目前商業生產的標準，就必須接受廣義的標準。在組培中微生物污染大致可分為：(一)、真菌。(二)、細菌。(三)、病毒、類病毒、植物菌質體(Agrios, 1988)。前二者可用肉眼看到，俗稱發霉，可直接丟棄，後者感染瓶苗必需用檢測的方式才可發現及作確認，根據 1997 年正式統計在全世界被發現的植物病毒約有 49 科 73 屬

[1]行政院農委會種苗改良繁殖場

977 種(Milton and Palukaitis, 2000)，每年因病毒損失約 600 億美金，因此組織培養健康種種苗，主要研究放在無病毒的健康種苗。

一、組培苗污染的問題

組織培養技術能夠容易成功應用到大量繁殖，通常用作為培殖體的部位 1.多數利用種子無菌播種、頂芽、側芽、花梗節腋芽、貯藏組織(球莖、塊根、塊莖)、根莖、走莖培養來大量生產組織培養苗，2.少部分使用葉片、花器(花瓣、花藥、子房、柱頭)、節間或根。3.使用生長點。根據不同的需求，前二者無法直接從植物體得到無病毒的健康組培苗，唯有生長點培養可得到無病毒株。培殖體在進入組培前所作的消毒工作，簡單的說，只是體表面的消毒，而且只針對真菌及細菌有效，對於有些病原微生物，例如病毒、類病毒、植物菌質體，以及部分專門入侵維管束輸導系統的細菌，則無法去除，這也就是一般俗稱的「內生菌」(Resident endophytic bacteria)，直到目前為止，也是組培技術發展中一直存在無法解決的問題，僅能儘量預防，加藥或其它處理作局部控制，最後只能用去除瓶苗，更新母瓶的手段來防止內生菌的擴大。

二、污染的原因及解決方法

造成微生物污染的的原因，包括以下四種情況：1.親本(培殖體)：植物體表面附有菌體，未能消毒完全，造成發霉。2.操作設備與器械：如無菌操作台、鑷子、刀子，無菌操作台台面消毒，使用前20分須打開循環風扇，過率網的有效性(阻塞或破損)。3.操作方法：人員操作時手部的消毒，講話、噴嚏都會造成程度上不等的污染，其它操作流程及培養瓶等器物擺設的位置，也會影響發霉。4.培養環境：此包括操作室及培養室的潔淨程度，潔淨度越高，直接或間接都會降低污染率。其解決方法：1.親本從外面收集回來，可先置於溫室一段時間，利用殺菌劑，減少表面附著菌體，另可利用在溫室中新長出之芽體，可減少污染原；種薯可置於室內或暗室預處理長出徒長之芽體；培植體可利用次氯酸鈉(NaOCl)，酒精等消毒劑，利用濃度及時間找到最佳組合，提高消毒成功率。2.化學藥劑處理(chemotherapy)：培養基添加殺菌劑或抗病毒藥劑(Howell *et al*., 2001),，Luna (2009)氏等人使用不同抗生素，並作不同組合，可以有效抑制瓶內細菌生長，Virazole可抑制病毒核酸的合成，用來去除梨之*Prunus necrotic ring spot virus* (PNRSV)和*Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)二種病毒(Cieślińska, 2007)。3.熱處理(thermotherapy)：親本在組培前高溫預處理(Howell *et al*., 2001)， 在切芽前利用高溫(28-36℃)培養4週，減弱病毒活力。4.操作設備與器械消毒：無菌操作台需注意濾網的有效使用時間及更換率網，使用生菌落塵測定儀(particle counter)，可檢測濾網有無破洞，初級過濾網使用阻塞會減少風量，造成內部正壓降低，影響污染，需適時更換，紫外線燈有效性會隨時間而衰減；鑷子、刀子消毒採用酒精燈(本生燈)滅菌，或採用高溫高壓殺菌鍋滅

菌，使用後者，可利用殺菌指示帶，高溫指示器，作殺菌確效，最常忽略的是高溫高壓殺菌鍋之殺菌確效，需作定期檢測保養，亦可置放一高溫指示器測試，藉由顏色的改變可了解殺菌鍋確實有無達到完全殺菌。此影響培養基及器械的消毒完全與否。5.人員的消毒多利用戴手術用手套配合75% 酒精殺菌，操作方法及流程需靠訓練及經驗來降低污染率。6.操作及培養環境，需作平時定時的消毒及配合生菌落塵測定儀檢測作確效，一般大型培養室設計多設有浴塵室，但需注意率網的更換，若使用無塵室(clean room)設計，需定時更換不同等級之過率網，培養室的定時消毒及人員物品進出的管制可延長無塵室的正壓及壽命。另為增加操作室的潔淨，可裝設紫外線燈，作為下班後，無人時的滅菌用，維持操作室的清淨度。

三、微生物污染判斷時機與檢測方法

在組織培養過程中因細菌或真菌造成的污染，從培殖體植入培養基中開始算起，培養基出現菌斑，而被肉眼發現及判斷，可因出現天數不一樣而大致可判斷何種原因造成之污染，其中可分為1.第一天(即培植體移入次日)即看到菌斑，此多為培養基消毒不完全。2.第3-5天發現菌斑，此多為人為操作、器械、培殖體消毒不完全，或內生菌所造成。3.若為14-30天才發現則此多為內生菌及蓋瓶不當造成之污染。4.若為半年以上才發現，則多為培養環境及蓋瓶不當或破損所造成，少為內生菌所造成，對於繼代多次或多年的瓶苗，可能在某次繼代不當造成污染。對於病毒所造成的污染，無法用肉眼或菌斑發現，由於培養基中為富含營養及高生長調節劑的關係，芽體生長旺盛，無法出現嵌紋病毒的特徵，此需用檢測方法來判斷。一般檢測的方法隨著生物科技的進步不斷創新，目前一般使用：1.培養基測試法，利用多次繼代培養，不斷淘汰污染瓶。達到篩選的目的(Knauss ,1976)。2.利用血清(Edwards and Cooper 1985)及抗體檢測(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。3.核酸探針(polymerase chain reaction, PCR) (Sediva *et al*., 2006)檢測DNA或RNA。前者用於檢測真菌及細菌，後二者可用於檢測真菌、細菌及病毒。有關病毒檢測，在使用抗體或核酸檢測二法中，在成本上使用ELISA較PCR便宜，在敏感度上PCR較準確，因此重點在使用時機，若檢測瓶苗中的病毒，則以核酸檢測較準確，因瓶內芽體病毒含量及活力較低，ELISA讀值低可能造成誤差，若將瓶苗移出瓶外隔離種植，成活後，採取第一片葉片檢測，則可以使用ELISA，敏感度增加，較省成本。

組培苗變異

組織培養是利用已知的培養條件，作人為的操控，達到最終增殖及增產目的，其中應用的原理之一，就是藉由細胞不斷的分裂增殖(cell proliferation)，經

過分化(differentiation)，而形成器官(organ)或組織(tissue)，在此過程中的第一步驟，細胞增殖，運用了生長調節劑(growth regulator)，俗稱荷爾蒙的添加，及不斷的繼代培養，因此培殖體在高生長調節劑且長時間培養在培養基中，細胞的增殖中，DNA 也隨之快速的複製，因此無形中增加了突變(mutation)的風險，影響了組培苗追求均一性的品質，當然從育種的角度，也在藉由非兩性結合，創造出不同 DNA 組合的新個體，而創造新品種，這是組培苗變異的唯一好處，但是組培苗大量生產追求的是性狀一致的品質，因此需要找到快速增殖與性狀一致的平衡點，也就是荷爾蒙添加的平衡點，荷爾蒙越多，增殖倍率越高，但芽體變小，有時呈過度叢生狀，成活率變低，變異率增加；荷爾蒙低，則繁殖倍率減少，不符合組培的經濟效率，失去組培的意義，適當的繁殖率有助於維持性狀一致性，叢生芽之繁殖倍率一般採用 2-4 倍，視種類而定，組培苗量產中為減少突變常用的二方法，分別為控制荷爾蒙及定時的更新母瓶，控制變異。另外荷爾蒙的選擇也很重要，近幾年來多種報告使用 thidiazuron(TDZ)進行增殖的報告，其具有極強的細胞分裂素活性，然而是否會引起組培苗變異仍有待探討。在組織培養報告中大多數使用細胞分裂素 BA 及生長素 NAA，培養出的植株，有的報告認為不影響變異 (Tokuhara. and Mii, 1998)，有的認為會產生變異 (Kane *et al*., 1987)。此外培養基中添加 2,4-D，可能會造成組織培養苗倍數體的變異 (Mishiba *et al*., 2000)，因此組培有效的增殖效率應兼顧移殖成活率及突變率。

組織培養健康種苗管理

過去組織培養研究重點大部分著重在增殖倍率，隨著商業及國際化腳步開始發現，病毒會隨著組培苗傳佈，健康種苗開始受到全球的重視，且多種機構建立檢查制度，包括國際種子檢查協會（International Seed Testing Association，簡稱 ISTA）之國際種子檢查規則（International Rules for Seed Testing）進行檢查程序，歐洲暨地中海地區植物保護組織（European and Mediterranean Plant Protection Organization，簡稱 EPPO）也針對 28 種無性繁殖作物種苗建立健康種苗檢查制度，並核發檢疫證明及種子檢查相關證書。 荷蘭種球檢查實驗室，協助農民栽植健康無病毒的種球及檢查種球病毒感染率，訂定分級標準制度。該國除了設有球根花卉檢查中心（Dutch Flower Bulb Inspection Service）之外，另設有園藝作物檢查服務中心（Naktuinbouw），專責其他花卉健康種苗檢查之工作，約可進行 80 種不同花卉病毒檢查及品質認證，並核發不同等級的證書。因此組織培養健康種苗的技術開發勢在必行，其執行必需達到下列要求：

一、無病毒的母本園及親本

組培母本保存園，必需具備可防止咀嚼式及刺吸式口器之昆蟲或軟體動物進入之設施。並有一離地的栽培架。禁菸，人員進入園區溫室(設施)工作前，需有簡單的消毒處理或戴手套及頭套。使用切芽工具需經高溫滅菌，應準備二套(或以上)工具，以一株一套使用為原則，避免株間工具交叉使用造成之污染。親本置入溫室中，需經病毒病檢查合格，使得放入，母本單株，須獨立標示並放置一區，單株間距加大，枝葉不得有相互接觸之機會，發現疑似病毒感染徵狀之病株，須立即單獨隔離或移出本園區。

二、組織培養作業管理

具備之操作台為「生產無病毒種苗專用無菌操作台」，不得與其它生產非無病毒等級種苗之無菌操作台混用，無菌操作台內工具需以高溫或火燄消毒，不得使用漂白水或藥劑消毒，操作使用相關工具(指切割刀具、鑷子及工作盤面)需以單株單芽為一批號，更換消毒(指高溫或火燄)再使用之，以單芽為一批號(單位)，建立初代培養之編碼制度，繼代培養生產階段須記錄世代之間之繼代次數、批號及瓶數之「生產記錄表」。

三、病毒的檢測及追蹤

確定利用組織培養繁殖健康種苗之親本在繁殖過程中有五個病毒檢測點(check point)，分別為(一)、母本期：母本需經目視無病毒徵狀，經一步用ELISA 檢測，確認無病毒始可進入切芽階段。(二)、該芽初代培養及經多次繼代培養產生之母瓶進入量產前需經 ELISA 及 PCR 檢查通過，才可進入量化生產。(三)、量化後之增殖芽體，在未來的多次繼代過程，利用 ELISA 及 PCR 法，採用不定期抽檢增殖瓶(四)、在瓶苗發根後，出貨前進行抽檢，合格後始出貨。(五)、若必需種植為穴盤苗(或一代種薯)才出貨，則需在穴盤苗(或一代種薯採收前)進行最後一次抽檢，避免病毒二次感染。

組織培養健康種苗的認證

台灣加入 WTO 後，為增加台灣種苗在國際競爭力，並與國際接軌，農委會防檢局積極推動植物健康種苗制度，除辦理強制性種苗檢查制度，推動輔導性種苗檢查認證制度，希望藉由市場機制輔導業者採用健康種苗，以降低病蟲害感染率，提昇種苗品質及產業競爭力。農委會於八十六年召開會議選定馬鈴薯、甘藷、大蒜、綠竹筍、草莓、甘蔗、豇豆、柑桔、香蕉、百香果、文心蘭、火鶴花、彩色海芋等十三種作物為推動對象，目前已推動執行組織培養健康種苗的認証包括：文心蘭：防檢局於九十一年三月十二日公告施行「文心蘭

無病毒種苗驗證作業須知」。於九十五年二月二十三日公告「文心蘭無病毒種苗驗證作業須知」修正為「文心蘭種苗病毒驗證作業須知」及修改部分規定內容，並明定種苗病毒感染分級標準。蝴蝶蘭：防檢局於九十二年八月邀請學者專家及業者就蝴蝶蘭種苗病毒驗證制度推動相關事宜提供意見，並訂定「蝴蝶蘭種苗病毒驗證作業須知（草案）」。經三年的討論修正，已於民國九十五年四月二十八日公告施行「蝴蝶蘭種苗病毒驗證作業須知」。

結 論

組織培養種苗產業為高資本及技術密集、高產值及國際流通的特色，在貿易國際化及經濟自由化的趨勢下，世界先進國家皆大力投資於組培苗之研究與開發，且種苗重量輕、體積小、運輸方便，因此國際間種苗貿易日漸擴大。植物組織培養健康種苗生產體系之建立及推動需要政府及民間業者共同努力，相互配合，期望政府不斷強化推動健康種苗驗證制度，研究單位的努力需配合產業的需要，加上產學間技術的轉移，增加種苗外銷的實力，提昇種苗產業在國際間的競爭力，為台灣農業開創另一個新契機，以因應種苗相關產業國際化後所面臨的競爭，台灣的組培苗在全球之定位是我國重要之種苗產業是否能順利升級，國際競爭力是否能持續提升的重要關鍵。

引用文獻

李紅曦、高清文、黃檍昌、張瑞璋。2002。文心蘭無病毒種苗驗證作業須知簡介. 農政與農情 119:11-17。

Agrios, G. N. 1988. Plant Pathology 3rd ed., Academic Press, New York, 803p

Cieślińska, M. 2007. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. J. Fruit Ornam. Plant Res. 15: 117-124

Edwards, M. L., and Cooper J. I.1985. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. J. Virol. Methods. 11(4):309-19.

Howell, W.E., Eastwell, K.C. ,and Li, T.S.C. 2001. Heat Treatment, chemo-therapy and hydroponic culture for obtaining virus-free trees of sweet cherry. Acta Hort. 550:455-458

Kane, M. E., Sheehan, T. J., and Philman, N. L. 1987. A micropropagation protocol using *Fraser photinia* for mutation induction and new cultivar selection. Proc. Fla. State Hort. Soc. 100:334-337.

Knauss, J. F. 1976. A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta*

cv."perfection" free of fungi and bacteria. Proc. Fla. state Hort. Soc. 89:293-296

Luna, C., Collavino, M., Sansberro, P. and Mroginski, L. 2009. Bacterial contamination in Ilex *dumosa* (Aquifoliaceae) cultures: antibiotic treatment. Acta Hort. 812:97-102

Milton, Z., and Palukaitis, P. 2000, Advances in Understanding Plant Viruses and Virus Diseases. Vol. 38: 117–143

Mishiba, K., Mii, M., 2000. Polysomaty analysis in diploid and tetraploid Portulaca grandiflora. Plant Science 156, 213－219.

Sediva, J., Novak, P., Kanka, J. and Laxa, J. 2006. Micropropagation, detection and elimination of DMV in the Czech collection of dahlia. Acta Hort. 725:495-498

Tokuhara, K., and Mii, M. 1998. Somaclonal variations in flower and inflorescence axis in micropropagated plants through flower stalk bud culture of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. Plant Biotechnol. 15:23-28.

The Health Management of Tissure Culture Seedling

Chi-Luan Wen[1]

Abstract

Many factors can influence the success of any healthy seedling enterprise, but micropropagation lends itself to successful management because conditions can be controlled by the practitioner. The most important of these factors are control microbial contamination and plant mutation by tissue culture technic. In healthy seedling management including: 1. A healthy mother-stock plant and explant. this discussion will assume biotic factors are controlled and will therefore focus primarily on factors influencing the stock plant and on explant performance. 2. Tissue culture management for healthy plantlet production, requirements/regulations under a proposed healthy seedling system for micropropagation-based seedling production. 3. virus detection and control. ELISA and PCR assay were used for detection of virus. 4. Essentials of health certification and assistance for the disease and pests of plantlets.

Key words: micropropagation, healthy plantlet, microbial contamination, mutation

[1] Taiwan Seed Improvement and Propagation Station, Shinshe, Taichung